

УДК 577.113.083:582.912.46

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МЕТОДОВ ЭКСТРАКЦИИ ОБЩЕЙ ГЕНОМНОЙ ДНК ГОЛУБИКИ ВЫСОКОРОСЛОЙ

**Н.В. ВОДЧИЦ, И.О. ЗАЙЦЕВА, И.Г. КИРИКОВИЧ,
Е.О. ЮРЧЕНКО, А.А. ВОЛОТОВИЧ**

*Полесский государственный университет,
г. Пинск, Республика Беларусь, volant777@tut.by*

Введение. Род *Vaccinium* L. включает около 450 видов, распространенных в Европе, Азии, Африке и Северной Америке. Среди них наиболее перспективный вид для культивирования в условиях Беларуси – это голубика высокорослая (*Vaccinium corymbosum* L.), которая выступает коммерчески важным, ценным пищевым и лекарственным растением [1, 2]. Показано, что наиболее высоким интегральным уровнем питательной и витаминной ценности характеризуются сорта «Reka», «Northblue», «Duke», «Weymouth», «Jersey», «Northland» и «Coville» [3].

В связи с высокой актуальностью культуры, а также высокой востребованностью и эффективностью фармакологических субстанций из растительного сырья голубики стоит задача строгой сертификации коллекционного и посадочного материала и коллекций *in vitro* на основе современных молекулярно–биологических и генетических методов, разработки протоколов проведения анализа и его стандартизации [2].

В настоящее время все большее значение приобретают методы, основанные на выяснении изменчивости последовательностей ДНК [4]. Существует много различных протоколов выделения ДНК, которые отличаются модификациями приемов разрушения клеточной стенки, стадий лизиса клеточных компонентов и очистки ДНК, и требуют разное количество рабочего времени [5].

Растения разных видов характеризуются различными биохимическими особенностями, присутствием различных веществ, создающих примеси в препаратах нуклеиновых кислот (полисахаридов, таннинов, полифенолов и их хинон–окисленных продуктов). Физико–химические свойства подобных веществ в определенной степени совпадают со свойствами нуклеиновых кислот, что затрудняет их полное отделение от ДНК и в дальнейшем препятствует полимеразной цепной реакции [4].

В настоящей статье приведены результаты сравнительного анализа двух методов выделения ДНК из тканей разных сортов голубики высокорослой с целью выявления наиболее продуктивного метода.

Методика и объекты исследования. Исследования были проведены на базе научно–исследовательской лаборатории прикладной и фундаментальной биотехнологии биотехнологического факультета учреждения образования «Полесский государственный университет» (далее БТФ ПолесГУ). Использовали ткани разных органов (стебель и лист) саженцев голубики высокорослой. Саженцы были произведены методом клонального микроразмножения *in vitro* на базе научно–исследовательской лаборатории клеточных технологий в растениеводстве БТФ ПолесГУ, и прошли адаптацию и доращивание до двухлетнего возраста на базе тепличного комплекса унитарного предприятия «Плантарум» (д. Добрая Воля Пинского района). В исследование были вовлечены сорта «Reka», «Northblue» и «Bluescrop».

ДНК выделяли двумя способами: по методу Ли и соавторов [6] и по методу Демпстер и соавторов [7], с небольшими модификациями. В частности, обработка препаратов РНКазой не проводилась. В первом случае выделение ДНК проводили следующим образом:

1. Готовили по числу образцов промывочный буфер (100 мМ Трис–HCl, pH 8.0; 50 мМ ЭДТА; 1 М NaCl; 1% 2–меркаптоэтанол; 1% поливинилпирролидон – ПВП) и лизис буфер (2% ЦТАБ; 1.42 М NaCl; 200 мМ ЭДТА; 100 мМ Трис–HCl, pH 8.0; 1% 2–меркаптоэтанол; 1% ПВП).

2. Ткань (0.03 г) заливалась жидким азотом в фарфоровой ступке. После испарения азота ткань растирали до порошкообразного состояния.

3. Порошок вносили в 1.5 мл пробирку с 1 мл промывочного буфера, пробирки держали на льду в течение 5 мин, перемешивая содержимое оборачиванием.

4. Пробирки центрифугировали (11000 g) в течение 10 мин при 4°C.

5. Верхний водный слой удаляли и добавляли 700 мкл разогретого до 60–65°C лизис–буфера, равномерно перемешивая гомогенат.

6. Образцы выдерживали в течение 60 мин при 65°C в твердотельном термостате или водяной бане (при этом их перемешивали 4–6 раз в процессе инкубации).

7. Давали пробиркам остыть в течение 4–5 мин, а затем добавляли равный объем фенол–хлороформ–изоамилового спирта (v/v, 25:24:1). Пробирки хорошо перемешивали оборачиванием в течение 1 мин и оставляли стоять 5 мин при комнатной температуре.

8. Пробирки центрифугировали 10 мин при 11000 g.

9. Верхний слой жидкости, около 750 мкл, осторожно переносили в новую пробирку. Повторяли шаги 7–9 один раз, но на шаге 7 добавляли 500 мкл смеси хлороформ–изоамиловый спирт (24:1).

10. К водной фазе в новых пробирках добавляли 2 объема 96% этанола. Осторожно оборачивали пробирки 3–5 раз для осаждения ДНК.

11. Верхнюю фазу, содержащую «туманность» ДНК переносили в новые 1.5 мл пробирки с 1 мл 70% этанола для промывания ДНК.

12. Шаг 11 повторяли ещё раз, но с этанолом в количестве 500 мкл. Оборачивали пробирки 3–5 раз. Центрифугировали 1 мин при 5000 g, и оставшуюся жидкость удаляли пипеткой. Затем промокали пробирки на фильтровальной бумаге и сушили их в течение 10 мин при комнатной температуре.

13. Осадок ДНК растворяли в 100 мкл ТЕ–буфера.

Согласно второму протоколу [7] выделение ДНК проводили следующим образом:

1. Образцы ткани (0.03 г) тщательно растирали пестиком в течение 5 минут в 1 мл предварительно прогретого до 65°C ЦТАБ–буфера (2% ЦТАБ; 1.4 М NaCl; 0.1 М Трис–HCl, pH 8.0; 20 мМ ЭДТА; 2% 2–меркаптоэтанол, 1% ПВП). Модификация протокола с увеличенным количеством меркаптоэтанол (2% вместо 0.4%) была сделана с учетом разработок лаборатории нехромосомной наследственности Института генетики и цитологии НАН Беларуси.

2. Гомогенат инкубировали в термостате при 65°C в течение 30 мин, периодически перемешивая раствор оборачиванием пробирки (трясти пробирку не рекомендуется, т.к. буфер пенится и ДНК фрагментируется).

3. Остудив пробирку до комнатной температуры, добавляли равный объем смеси хлороформ–изоамиловый спирт (24:1) и перемешивали медленным оборачиванием в течение 20 мин.

4. Разделяли фазы центрифугированием 15 мин при 12000 g; супернатант переносили в чистую пробирку объемом 2 мл.

5. Добавляли 2/3 объема изопропанола.

6. Оставляли на 1 час при –20°C для осаждения ДНК.

7. Центрифугировали 15 мин (13000 g) и отбирали изопропанол.

8. В конце добавляли два объема 80% этанола, центрифугировали 15 мин (13000 g), сливали и отбирали спирт дозатором, подсушивали пробирку на воздухе для удаления следов спирта; осадок ДНК растворяли в 100 мкл ТЕ–буфера (0.01 М Трис–HCl, pH 7.4, 0.1 мМ ЭДТА) до полного исчезновения осадка.

Приблизительную оценку качества экстракта проводили по интенсивности флуоресценции в УФ–свете после связывания нуклеиновых кислот с бромистым этидием в ходе горизонтального электрофореза в 0.8% агарозном геле [5].

Точное измерение концентрации ДНК проводили по объему полученного экстракта 1.5 мкл в 1–3 повторностях на спектрофотометре NanoDrop 1000, в диапазоне длин волн 220–350 нм. Коэффициент поглощения пересчитывался на толщину слоя раствора 10 мм.

Реакционная смесь для проведения ПЦР готовилась в объеме 25 мкл и включала следующие компоненты: 1× ПЦР–буфер «А» с (NH₄)₂SO₄, 2.5 мМ MgCl₂, 0.12 мМ смесь дНТФ, 20 пмоль праймера, 20 нг ДНК, 2 ед. *Taq*–полимеразы (все производства «Праймтех», Беларусь, за исключением смеси дНТФ марки Roti–Mix PCR 3 производства Carl Roth, Германия). Полимеразные цепные реакции проводились на термоциклере Biometra TP Basic Gradient по следующей программе: 94°C – 30 с; 40 циклов: 94°C – 1 мин, 50°C – 1 мин, 72°C – 1 мин; 72°C – 5 мин.

ПЦР–продукт оценивали с помощью горизонтального электрофореза в 2% агарозном геле, в трис–боратном буфере, при напряжении 50–60 В, в течение 60 мин. ПЦР–продукт наносили в гель в количестве 1–5 мкл, вместе с 1–3 мкл загрузочного красителя состава бромфеноловый синий + глицерин. Перед форезом до застывания геля в него вносили бромистый этидий из расчета 0.5 мкг/мл. Визуализация результатов электрофореза проводилась в приборе гель–документирования Quantum ST4.

Результаты и их обсуждение. Одним из основных способов получения препарата ДНК из растительных тканей является метод, основанный на использовании буфера с ЦТАБ (цетилтриметиламмонийбромидом). При этом при высоких концентрациях солей нуклеиновые кислоты образуют стабильные и растворимые соединения с ЦТАБ [4].

Исследователи цитируют 11 модификаций данного метода, которые включают не только различные концентрации собственно буфера, но и добавление протеиназы К, меркаптоэтанола, использование смесей фенол–хлороформ–изоамиловый спирт, хлороформ–изоамиловый спирт и др. для лучшей очистки ДНК. Содержащиеся в экстракционном буфере полимеры поливинилпирролидона (ПВП) связываются с фенолами, мешая образованию их комплексов с ДНК. В присутствии в буфере экстракции ЭДТА, хелатирующего агента, связывающего ионы металлов (Mg^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{3+} и др.), происходит дезактивация металл–зависимых ферментов, находящихся в растительных экстрактах, в том числе нуклеаз, разрушающих ДНК. Меркаптоэтанол осаждает белки и полисахариды как нерастворимый комплекс. Он разрушает дисульфидные мостики, в том числе и в белках, с нарушением их третичной и четвертичной структуры, и действует как биологический антиоксидант, ингибируя окислительные процессы, которые напрямую или косвенно повреждают ДНК. При снижении концентрации соли NaCl ниже 0.4 М комплекс ЦТАБ–нуклеиновая кислота выпадает в осадок. После разрушения клеток белки денатурируют и экстрагируют смесью хлороформа с изоамиловым спиртом [8].

Мы применили и сравнили две модификации ЦТАБ–метода. Оба протокола выделения ДНК из растений рода *Vaccinium* требуют одних и тех же реагентов и занимают в среднем 4–5 часов.

Необходимо отметить, что мы использовали ПВП, который связывает полифенольные соединения и меркаптоэтанол, а также устраняет желтую и коричневую окраску препаратов ДНК. Тем не менее, осадок, полученный согласно протоколу [6], остался окрашенным в коричневый цвет. ДНК, полученная по протоколу [7], была бесцветной.

В двух случаях мы получили осадки разного цвета: коричневого цвета ДНК, полученную методикой по Li & al., 2007 [6] и белого цвета ДНК, полученную протоколом Dempster & al., 1999 [7]. В таблице приведены данные спектрофотометрии, характеризующие концентрацию и чистоту полученных экстрактов ДНК.

Таблица – Спектрофотометрические характеристики образцов ДНК

№ образца	Сорт	Концентрация ДНК, нг/мкл	$\lambda_{260}/\lambda_{280}$	Концентрация ДНК, нг/мкл	$\lambda_{260}/\lambda_{280}$
		Протокол по [7]		Протокол по [6]	
1	‘Bluecrop’ (лист)	170	1.89	42	1.18
2	‘Bluecrop’ (стебель)	168	1.85	29	0.92
3	‘Northblue’ (лист)	113	2.11	11	0.79
4	‘Northblue’ (стебель)	134	1.82	4.5	1.67
5	‘Reka’ (лист)	59	1.84	7.5	1.75
6	‘Reka’ (стебель)	51	1.57	5	2.41
Среднее		116	1.85	16	1.45

Анализ препаратов ДНК, полученных протоколом [6], показал, что соотношение поглощения при $\lambda=260/280$ нм, в среднем, было равно 1.45. Это свидетельствует о том, что полученные образцы ДНК содержат примеси. Самая высокая концентрация выделенной ДНК равнялась 42 нг/мкл, а минимальная – 4.5 нг/мкл.

В свою очередь препараты ДНК, полученные согласно протоколу [7], имели соотношение поглощения при $\lambda=260/280$ нм равное, в среднем, 1.85. При этом наивысшая концентрация ДНК составляла 170 нг/мкл, а наименьшая – 51 нг/мкл.

На рисунке 1А представлена спектрофотометрическая диаграмма одного из образцов, полученных по протоколу [6]. На диаграмме видно, что пик поглощения приходится на область $\lambda=225–230$ нм. При исследовании всех шести образцов пики приходились на эту область. Как отмечается в литературе, УФ–спектры фенольных соединений характеризуются двумя максимумами поглощения: 215–220 нм с плечом в области 230–240 нм и 325–330 нм с плечом в области 295–300 нм [9]. Также мы можем предположить, что в растворе есть примеси гидроксикоричных кислот, которые

присутствуют в растениях рода *Vaccinium* и имеют максимумы поглощения в областях 220–230 нм и 320–330 нм. Для *p*-кумаровой кислоты характерно наличие двух максимумов поглощения в УФ–спектре: 225–230 нм и 308–313 нм [10].

На рисунке 1Б представлена спектрофотометрическая диаграмма для одного из образцов, полученных протоколом по [7]. Пик поглощения для данной серии экстрактов приходился на участок около 260 нм. Это говорит о том, что исследуемые образцы удовлетворяют требованиям очистки ДНК.

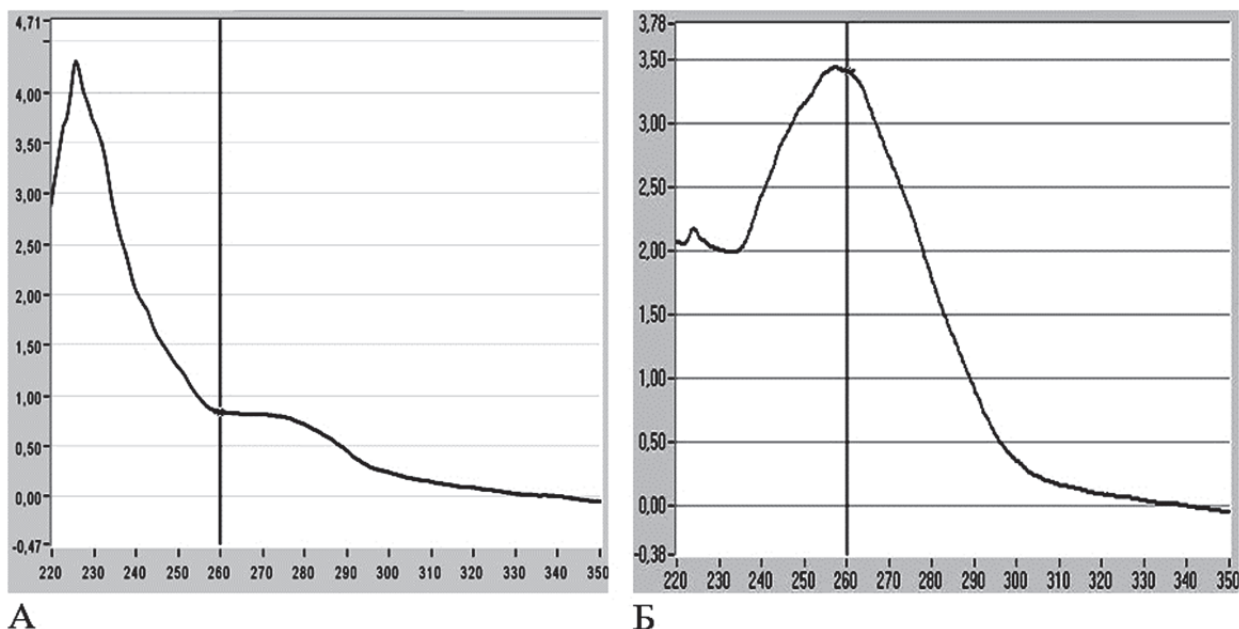


Рисунок 1 – Спектры поглощения для препаратов ДНК полученных из листьев голубики сорта ‘Bluescop’, согласно протоколу по [6] (А), и по [7] (Б)

На рисунке 2А представлена электрофореграмма образцов ДНК голубики, выделенных протоколом по [6] (см. таблицу). Свечение рядом с лункой (обозначено знаком *) указывает на наличие тяжелых, малофрагментированных фракций ДНК.

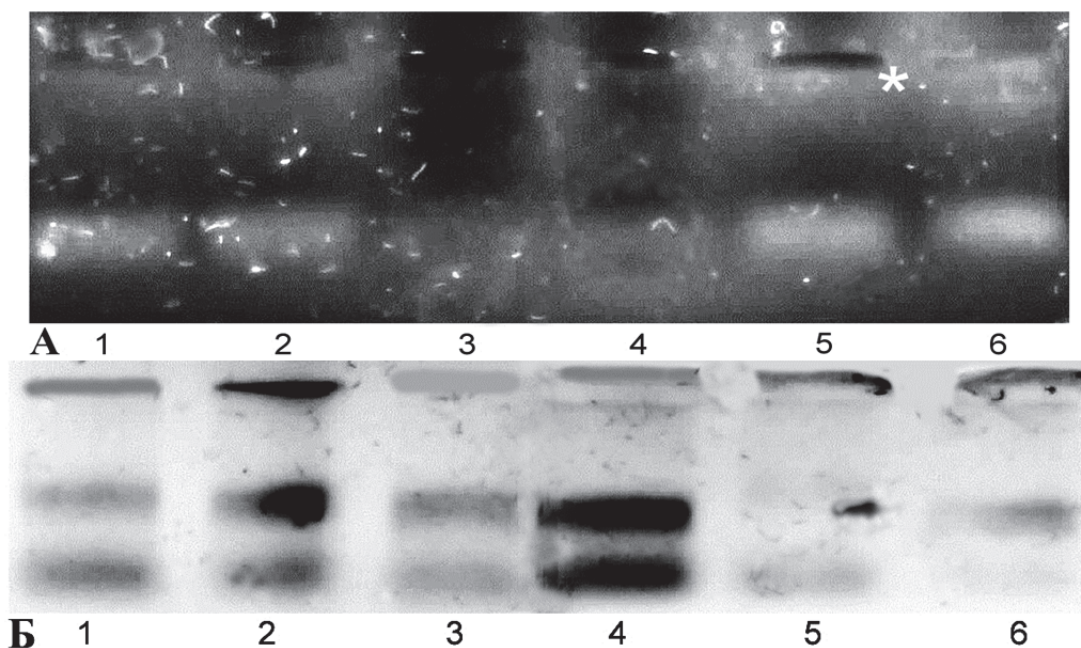


Рисунок 2 – Электрофореграмма образцов общей ДНК, выделенных из голубики согласно протоколам по [6] (А) и по [7] (Б)

На электрофореграмме образцов ДНК голубики, выделенных протоколом по [7] (см. таблицу) видно, что ДНК светится в виде довольно компактной полосы, расположенной ближе к лунке, что свидетельствует о ее малой фрагментации (рисунок 2 Б).

Оценку эффективности полимеразной цепной реакции с ДНК–матрицей, выделенной по второму протоколу (см. таблицу), проводили с использованием ISSR–праймера UBC 818 (рисунок 3).

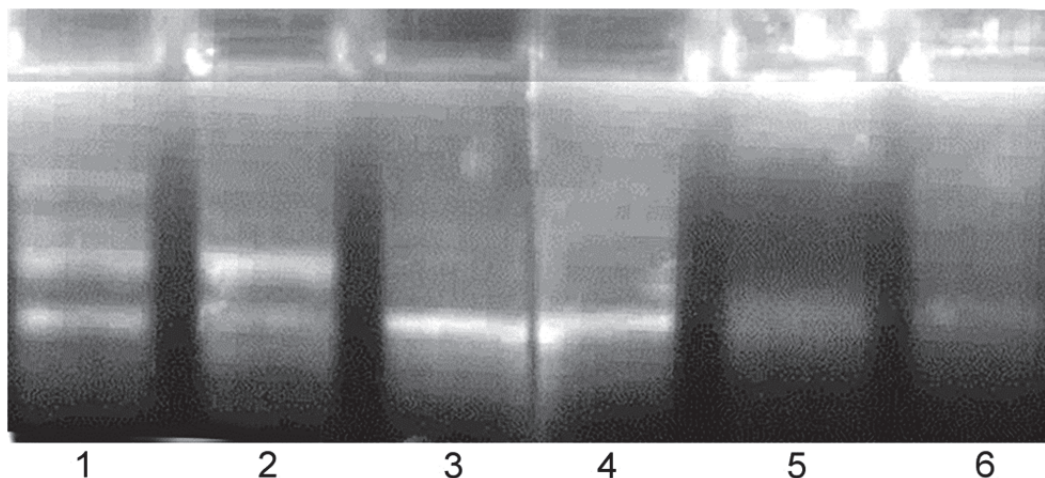


Рисунок 3 – Электрофореграмма продуктов ПЦР с использованием ISSR–праймера UBC 818, для ДНК голубики, полученной по протоколу [7]

В результате проведения ПЦР с использованием в качестве матрицы ДНК, выделенной по протоколу [7], в большинстве случаев наблюдалось достаточное количество продукта и хорошая воспроизводимость ISSR–маркеров, что свидетельствует об удалении ингибиторов ПЦР.

Выводы. Работа с *V. corymbosum* показала биохимическую «проблемность» этого вида растения как носителя большого количества веществ, ингибирующих ПЦР в недостаточно очищенных экстрактах ДНК.

Сравнительный анализ выбранных методов экстракции ДНК для растений рода *Vaccinium* показал, что успешная ISSR–ПЦР идет при устранении ингибирующих веществ, которые выявляются в спектре поглощения экстракта по пику 225–230 нм. Устранение ингибирующих веществ достигается с помощью протокола по Демпстеру и соавторам [7], который можно условно назвать «протокол ЦТАБ–ПВП–меркаптоэтанол для растений с высоким содержанием полифенолов и полисахаридов».

Для проведения ISSR–ПЦР методика выделения ДНК по Ли и соавторам [6] не является вполне эффективной. Полученные образцы ДНК поддаются амплификации, но ПЦР–продукт слабый, т. к. большинство выделенных образцов находятся в диапазоне низких концентраций и в них присутствуют «цветные» примеси.

Для обоих протоколов наибольший выход нуклеиновых кислот наблюдался из зеленых листьев, наименьший – из стебля.

ЛИТЕРАТУРА

1. Рупасова, Ж.А. Фиторекультивация выбывших из промышленной эксплуатации торфяных месторождений севера Беларуси на основе возделывания ягодных растений семейства Ericaceae / Ж.А. Рупасова, А.П. Яковлев, В.Н. Решетников. – Минск, 2011. – 282 с.
2. Спиридович, Е.В. Молекулярные маркеры в таксономии и сохранении генетических ресурсов голубики высокой (*Vaccinium corymbosum* L.) / Е.В. Спиридович, А.Б. Власова, А.Н. Юхимук, Л.В. Гончарова, Е.Д. Агабалаева, Е.Н. Решетников // Опыт и перспективы возделывания голубики на территории Беларуси и сопредельных стран: Мат–лы междунар. науч.–практ. конф. Минск, 17–18 июля 2014 г. / Центр. бот. сад НАН Беларуси; редкол.: В.В. Титок (отв. ред.) [и др.]. – Минск, 2014. – С.101– 108.
3. Рупасова, Ж.А. Сравнительная оценка биохимического состава плодов перспективных сортов голубики высокорослой в условиях Беларуси / Ж.А. Рупасова, В.Н. Решетников, Н.Б. Павловский, А.П. Яковлев, А.М. Бубнова // Голубиководство в Беларуси: итоги и перспективы: Мат–лы Респ. науч.–практ. конф. Минск, 17 августа 2012 г. / Центр. бот. сад НАН Беларуси; редкол.: В.В. Титок (отв. ред.) [и др.]. – Минск, 2012. – С.62– 66.

4. Калаев, В.Н. Разработка метода получения препарата суммарной ДНК высокого качества из растений рода *Rhododendron* / В.Н. Калаев, О.А. Землянухина, И.Ю. Карпеченко, К.А. Карпеченко, А.М. Кондратьева, В.Н. Вепринцев, Н.А. Карпеченко, С.С. Карпова // Фундаментальные исследования. – 2012. – № 5. – С. 148–152.
5. Юрченко, Е.О. Основы молекулярного маркирования грибной ДНК: Практическое руководство / Е.О. Юрченко, М.Г. Синявская; Ин-т эксперим. ботаники НАН Беларуси. – Минск: Право и экономика, 2007. – 101 с.
6. Li, J.T. An optimized mini-preparation method to obtain high-quality genomic DNA from mature leaves of sunflower / J.T. Li, J. Yang, D.C. Chen, X.L. Zhangand, Z.S. Tang // Gen. Mol. Res. – 2007. – Vol. 6. – P. 1064–1071.
7. Dempster, E.L. Rapid DNA extraction from ferns for PCR-based analyses / E.L. Dempster, K.V. Pryor, D. Francis, J.E. Young, H.J. Rogers // Biotechnique. – 1999. – Vol. 27, No. 1. – P. 66–68.
8. Рябушкина, Н.А. Специфика выделения ДНК из растительных объектов / Н.А. Рябушкина, М.Е. Омашева, Н.Н. Галиакпаров // Биотехнология. Теория и практика. – 2012. – № 2. – С. 9–26.
9. Верниковская, Н.А. Идентификация и хроматографическое определение фенольных соединений в тысячелистнике обыкновенном / Н.А. Верниковская, З.А. Темердашев // Аналитика и контроль. – 2012. – Т. 16, № 2. – С. 188–195.
10. Медведев, Ю.В. Исследование содержания фенолокислот в лекарственном и пищевом растительном сырье методом ВЭЖХ : дисс. ... канд. фармац. наук: 14.04.02 / Ю.В. Медведев. – М., 2010. – 143 с.

Благодарность. Авторы признательны сотруднику лаборатории нехромосомной наследственности ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси» (г. Минск) М.Г. Синявской за консультативную поддержку и помощь в проведении экспериментов.

COMPARISON OF THE METHODS OF TOTAL GENOMIC DNA EXTRACTION FROM Highbush BLUEBERRY

***N.V. VODCHITS, I.O. ZAITSEVA, I.G. KIRIKOVICH,
E.O. YURCHENKO, A.A. VOLOTOVICH***

Summary

Two protocols of DNA extraction from *Vaccinium corymbosum* leaves and stems (according to Li et al., 2007, with modifications; according to Dempster et al., 1999, with modifications) were tested. Both protocols were designed for application to the tissues with high contents of PCR inhibitors and based on thermal lysis in buffer containing CTAB, EDTA, NaCl, 2–mercaptoethanol and PVP. The first protocol includes extraction by phenol, chloroform and isoamyl alcohol, and DNA precipitation by ethanol. The second includes extraction by chloroform and isoamyl alcohol, and DNA precipitation by isopropanol. DNA extracts obtained by the second protocol were of high purity and provided enough products in ISSR–PCR.

© Водчиц Н.В., Зайцева И.О., Кирикович И.Г., Юрченко Е.О., Волотович А.А.

Поступила в редакцию 24 сентября 2014г.